Aus der Hautklinik der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. Dr. A. Greither)

Einfluß von Chloroquin auf die Hexachlorbenzol-induzierte Porphyrie der Ratte

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Kurt Simon

Kurt Weber

1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535703_0003

Aus der Hautklinik der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. Dr. A. Greither)

Einfluß von Chloroquin auf die Hexachlorbenzol-induzierte Porphyrie der Ratte

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Kurt Simon

Kurt Weber

1982

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Arnold

Referent
gez.: Prof. Dr. Goerz

Korreferent
gez.: Prof. Dr. Strohmeyer

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Hexachlorbenzol als Porphyrogen	1
1.2.	Porphyria cutanea tarda	1
1.3.	Therapie der Porphyria cutanea tarda	2
1.4.	Hexachlorbenzol-induzierte Porphyrie der Ratte als Modell der Porphyria cutanea tarda	2
2.	Material und Methoden	4
2.1.	Tiere und Behandlung	4
2.2.	Versuchsanordnung	4
2.3.	Bestimmung der Porphyrine und Porphyrin-Vorstufen im Urin	5
2.3.1.	Gesamt-Porphyrine	5
2.3.2.	Porphobilinogen	6
2.3.3.	5-Aminolävulinsäure	7
2.4.	Gesamt-Porphyrin-Bestimmung in der Leber	7
2.5.	Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Porphyrine	8
2.5.1.	Auftrennung der Urin-Porphyrine	8
2.5.2.	Auftrennung der Leber-Porphyrine	9
2.6.	Uroporphyrinogen-Decarboxylase-Bestimmung	10
2.7.	Gewinnung und Bestimmung der mikrosomalen Proteine	11
2.8.	Cytochrom P-450-Gehalt	12
2.9.	O-Desalkylierung von 7-Ethoxycoumarin	12
2.10.	NADPH-Cytochrom c-Reduktase	13
2.11.	Reagenzien	14

Seite

3. Ergebnisse..... 15
3.1. Gesamt-Porphyrin-Ausscheidung im Urin..... 15
3.2. Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Porphyrine..... 16
3.3. Porphobilinogen-Ausscheidung..... 16
3.4. 5-Aminolävulin-Ausscheidung..... 17
3.5. Cytochrom P-450-Gehalt..... 17
3.6. 7-Ethoxycoumarin-O-Desalkylierungs-Aktivität..... 18
3.7. NADPH-Cytochrom c-Reduktase..... 18
3.8. Uroporphyrinogen-Decarboxylase..... 18
3.9. Tabellen 1-6..... 19

4. Diskussion..... 30

5. Zusammenfassung..... 35

6. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen... 37

7. Literaturverzeichnis..... 38

1. EINLEITUNG

1.1. Hexachlorbenzol als Porphyrogen

Hexachlorbenzol (HCB) wird weltweit als Fungizid eingesetzt. Nachdem 1959 in der Türkei HCB-behandeltes Saatgut fälschlich für Nahrungszwecke verwendet worden war, trat dort vermehrt ein Krankheitsbild auf, das große Ähnlichkeit mit der Porpyria cutanea tarda (PCT) hatte (3,4,21,25). Diese Häufung von Porphyrie-Erkrankungen in der Türkei zeigte erstmals eine Form der hepatischen Porphyrie, die vorherrschend exogen ausgelöst worden war.

1.2. Porphyria cutanea tarda

Bei der "spontanen" PCT werden außer der genetischen Disposition zusätzlich exogene Manifestationsfaktoren für die Entstehung der Erkrankung angenommen (11). Die Stoffwechselstörungen bei der PCT bestehen im wesentlichen in einer gesteigerten Porphyrin-Bildung in der Leber, aufgrund einer Störung der Uroporphyrinogen-Decarboxylase (9,17), einer vermehrten Ausscheidung hochcarboxylierter Porphyrine im Urin, sowie einer verstärkten Ablagerung der Porphyrine in den Organen, z.B. auch in der Haut (11). Die Porphyrin-Ablagerungen in der Haut führen zu einer Photosensibilität, die jedoch nur zum Teil die typischen Hautveränderungen an Handrücken und Gesicht erklärt, während die übrige, z.T. auch lichtexponierte Haut, unverändert ist.

1.3. Therapie der Porphyria cutanea tarda

Therapeutisch stehen heute verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung:
Die Aderlaßtherapie nach IPPEN (15) und die niedrig dosierte Chloroquin-Behandlung nach KORDAC und SEMRADOVA (16) oder eine Kombination beider Methoden (30). Obwohl beide Behandlungs-Möglichkeiten zu einer deutlichen Besserung des klinischen Bildes und zu einer Normalisierung der Porphyrin-Ausscheidung führen, sind die Wirkungsmechanismen der Therapie noch weitgehend ungeklärt. Über den Pathomechanismus der Therapie mit Chloroquin (CQ) bestehen zur Zeit zwei Theorien. Einmal wird die Bildung von wasserlöslichen Komplexen aus Porphyrinen und CQ angenommen, wodurch eine vermehrte Ausschwemmung der abgelagerten Porphyrine erfolgen soll (27). (Diese Therapie ist vergleichbar der Uralyt-U-Behandlung, wobei durch die Alkalisierung des Urins eine gesteigerte renale Porphyrin-Ausscheidung erzielt wird). Zum anderen postuliert man eine direkte Einwirkung des CQ auf die Enzyme der Häm-Biosynthese, wodurch eine verminderte Porphyrin-Biosynthese erfolgt (33).

1.4. Hexachlorbenzol-induzierte Porphyrie der Ratte als Modell der Porphyria cutanea tarda

Um den Wirkungsmechanismus des CQ auf die PCT näher charakterisieren zu können, wurden am Modell der HCB-induzierten Porphyrie der Ratte, das biochemisch zahlreiche Ähnlichkeiten mit der PCT hat, entsprechende Untersuchungen durchgeführt (28).

Bei beiden Stoffwechselstörungen ist die Aktivität der Uroporphyrinogen-Decarboxylase stark vermindert, und es herrscht die Vermehrung der hochcarboxylierten Porphyrine (Uroporphyrin) in der Leber und ihre Ausscheidung im Urin vor (8,17). Unsere Untersuchungen sollten erklären, welchen Einfluß die CQ-Applikation auf die Manifestation und auf den Verlauf der HCB-induzierten Porphyrie bei der Ratte hat.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Tiere und Behandlung

Für den Versuch wurden 200 g schwere weibliche Wistar-Ratten (Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover, BRD) verwendet und in neun verschiedene Versuchsgruppen eingeteilt. Alle Tiere erhielten Standarddiät (Altromin, Lage/Lippe, BRD) und hatten freien Zugang zu Wasser und Futter.

2.2. Versuchsanordnung

I. Kontrollen (unbehandelte Tiere)

II. CQ-Kontrollen

Diese Tiere erhielten 6 mal pro Woche CQ in einer Dosis von 25 mg/kg (oral in Wasser mit einer Schlundsonde appliziert).

III. HCB-Kontrollen

Diesen Tieren gaben wir während der gesamten Versuchsdauer eine 0,05% w/w HCB-haltige Standarddiät.

IV. HCB-Absetz-Kontrollen

Bis zum 51. Tag wurden die Tiere mit HCB-Diät, danach mit Standardfutter ernährt.

V. HCB-Absetz-Therapie-Gruppe

Diese Tiere wurden wie Gruppe IV behandelt, bekamen jedoch vom 51. Tag an zusätzlich 25 mg/kg CQ verabreicht.

VI. HCB + CQ-Prophylaxe-Gruppe (5 mg)

Diesen Tieren gaben wir von Versuchsbeginn HCB-haltiges Futter und CQ in einer Dosis von 5 mg/kg.

VII. HCB + CQ-Prophylaxe-Gruppe (25 mg)

Behandlung wie bei Gruppe VI, jedoch wurde eine CQ-Dosis von 25 mg/kg gewählt.

VIII. CQ-Therapie-Gruppe (5 mg)

Diese Tiere wurden während der gesamten Versuchsdauer mit HCB-haltigem Futter ernährt. Nach dem 51. Tag wurden die Tiere zusätzlich mit CQ in einer Dosis von 5 mg/kg behandelt.

IX. CQ-Therapie-Gruppe (25 mg)

Wie Gruppe VIII, aber mit einer CQ-Dosis von 25 mg/kg.

2.3. Bestimmung der Porphyrine und Porphyrin-Vorstufen im Urin

Vom 43. Tag an wurde wöchentlich der 24-Stunden-Urin der Tiere zur Bestimmung der Gesamt-Porphyrine und der Vorstufen, 5-Aminolävulinsäure (ALA) und Porphobilinogen (PBG), aufgefangen. Am Versuchsende (107. Tag) wurden die Tiere durch Genickschlag getötet, die Lebern entnommen und sofort untersucht.

2.3.1. Gesamt-Porphyrine

Die quantitative Porphyrin-Bestimmung erfolgte nach

der Methode von DOSS und SCHMIDT (6) durch Ionenaustausch-Chromatographie. Die Ionenaustauschsäulen wurden mit 1 ml Urin gefüllt, mit ca. 10 ml Aqua dest. gewaschen, und anschließend die Porphyrine mit 2 mal 2 ml 3N HCl eluiert. Die Extinktion der Lösung wurde bei den Wellenlängen 380 nm und 430 nm, sowie bei dem Soret-Maximum (E_{max}), gemessen. Die korrigierte Extinktion (E_{corr}) berechneten wir nach der Formel:

$$E_{corr} = 2 \times E_{max} - (E_{430} + E_{380})$$

Der Porphyrin-Gehalt in µg/ml ergab sich aus:

$$E_{corr} \times 5 = \mu g/ml$$

Durch Multiplikation mit der 24 h-Urinmenge (ml) erhielten wir die Gesamt-Tagesausscheidung.

2.3.2. Porphobilinogen

Wir bestimmten das PBG im Urin nach der Methode von DOSS und SCHMIDT (7) mit Hilfe von Anionen-Austauschersäulen. In die Säulen wurde 0,5 ml Urin gegeben, diese dreimal mit je 10 ml Aqua dest. gewaschen, und das PBG mit 4 ml 1 M Essigsäure eluiert. 15 Min. nach Zugabe von 4 ml Ehrlich's Reagenz wurde gegen einen Leerwert bei 553 nm gemessen. Für die Berechnung des PBG-Gehalts benutzten wir die Formel:

$$PBG\ (\mu g/ml) = E_{553} \times 88$$

Die Gesamtausscheidung ergab sich wieder aus der Multiplikation mit der gesammelten Urinmenge.

2.3.3. 5-Aminolävulinsäure

Nach DOSS und SCHMIDT (7) verwendeten wir für die Bestimmung der ALA im Urin Doppelionen-Austauschersäulen. Die Anionenaustauscher wurden auf die Kationenaustauscher gesetzt. Durch die obere Säule wurden der störende Harnstoff und das PBG gebunden, während wir aus der unteren mit 7 ml 0,1 M Natriumacetat die ALA in Reagenzgläser, die 200 µl Acetylaceton enthielten, eluierten. Die Proben wurden genau 10 Min. in kochendes Wasser gestellt und nach rascher Abkühlung des Eluats, 7 ml Ehrlich's Reagenz hinzugegeben. Nach 15 Min. Reaktionszeit wurde gegen den Reagenzienleerwert bei 553 nm die Extinktion gemessen:

$$ALA\ (\mu g/ml) = E_{553} \times 60$$

Die Tagesausscheidung wurde entsprechend berechnet.

2.4. Gesamt-Porphyrin-Bestimmung in der Leber

Bei den Tieren der Gruppe IV (HCB-Absetz-Kontrollen) und V (HCB-Therapie-Gruppe) bestimmten wir die Leberporphyrine nach folgender Methode:

1 g Leber wurde gefriergetrocknet, im Mörser staubfein gemahlen und in ein dickwandiges Reagenzglas

gegeben. Die getrocknete Leber wurde anteilmäßig mit einem Gemisch aus 4 Teilen Essigsäureäthylester und einem Teil Eisessig verrührt und durch eine Glasfritte G 3 filtriert. Das Filtrat wuschen wir im Extraktionsgefäß 5 mal mit ca. 3 ml Aqua dest., wobei wir die Wasserphase jeweils verwarfen. Anschließend extrahierten wir die Porphyrine 5 mal mit je 5 ml 3 N HCl. Das Eluat wurde im Meßzylinder mit 3 N HCl auf 50 ml aufgefüllt und die Extinktionen bei 380 nm, 430 nm und . . . der Soret - Bande gemessen. Der Porphyringehalt in µg/g Leber ergab sich aus der Formel:

$$\text{Porphyringehalt } (\mu g/g) = E_{corr} \times 1{,}1842 \times 50$$

2.5. Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Porphyrine

Bei den o.g. Gruppen wurden außerdem die Leber- und Urinporphyrine chromatographisch aufgetrennt.

2.5.1. Auftrennung der Urin-Porphyrine

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Porphyrine im Urin wurde nach der von DOSS (5) beschriebenen Methode durchgeführt.

Der Urin wurde mit einigen Tropfen Essigsäure angesäuert, und die Porphyrine an Talkum gebunden (0,5 g/50 ml). Anschließend wurde auf einer Glasfritte (G 4) mit Aqua dest. gewaschen. Nach Trocknen

bei 100° C über 45 Min. wird die Veresterung der Porphyrine mit einem Gemisch aus 5 Teilen Schwefelsäure und 95 Teilen Methanol durchgeführt. Der Ansatz verblieb hierzu mindestens 12 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die noch an Talkum gebundenen Porphyrinester wurden unter UV-Kontrollen mit Chloroform ausgewaschen. Die Lösung wurde dann mit Aqua dest. gereinigt, mit Natriumbicarbonat neutralisiert, und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Die Mischung wurde filtriert, und das Filtrat im Rotationsverdampfer eingeengt. Der Rückstand wurde in ca. 100 µl Chloroform aufgenommen. Die Porphyrinlösung und die Referenzsubstanzen trugen wir auf die mit Kieselgel beschichteten Platten auf, die wir mit einem Chloroform-Methanol-Gemisch (2:1 v/v) vorbehandelten und 60 Min. bei 100° C aktiviert hatten. Als Laufmittel benutzten wir zunächst ein Chloroform-Methanol-Gemisch (130: 20 v/v) zur Konzentrierung der aufgetragenen Porphyrin-Probe. Die Trennung der Porphyrine erfolgte in einem Benzol-Essigsäureethylesther-Methanol-Gemisch (85:13,5: 1,5 v/v). Die dünnschichtchromatographisch aufgetrennten Porphyrin-Fraktionen wurden mit Hilfe des Auswertgerätes (Zeiss PMQ II) bestimmt.

2.5.2. Auftrennung der Leberporphyrine

Die aus den gefriergetrockneten Lebern gewonnenen HCl-Extrakte neutralisierten wir mit Natriumbicarbonat und säuerten mit einigen Tropfen Eisessig an. Die Porphyrine wurden an Talk gebunden, und nach Elution wurde die dünnschichtchromatographische Auftrennung, wie oben beschrieben, vorgenommen.

2.6. Uroporphyrinogen-Decarboxylase-Bestimmung

Die Untersuchung wurde nach der Methode von MAUZERAL und GRANICK (20) durchgeführt.

Zur Uroporphyrinogen-Präparation wurde Natriumamalgam mit einem Na-Gehalt von 5% gemahlen. Hiervon gaben wir 2 g zu 4 ml Uroporphyrin-Lösung (Ca. 4 x 10^{-4} M in 1 mM KOH) und mischten intensiv unter Licht- und Luftausschluß. Nach etwa 3 Minuten verschwand die Rotfärbung der Porphyrine (Bildung von Porphyrinogen). Danach wurde sofort filtriert und die Lösung unter Stickstoff mit 40% H_3PO_4 auf pH 6,8 eingestellt und in dieser Form sofort als Inkubationsansatz verwendet:

0,1 ml Uroporphyrinogen-Lösung

1,4 ml Puffer: 60 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4, 3,25 mM GSH 0,1 mM DTE pH 6,8

o,5 ml Leberhomogenat (1:5)
60 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4
1 mM GSH pH 6,8

Der Ansatz wurde eine Stunde bei 37° C im Dunkeln unter Luftabschluß inkubiert, nachdem er unmittelbar vor Beginn der Inkubation mit N_2 begast worden war. Das gebildete Koproporphyrin wurde nach BRODIE et al. (2) isoliert, nachdem die Inkubation mit 9 ml Essigsäureethylester/Essigsäure (2:1)

gestoppt worden war. Uroporphyrin wurde durch 2-malige Extraktion mit gesättigter Natriumacetat-Lösung (2 x 5 ml) entfernt, und das Koproporphyrin mit 2 x 2 ml 1 N HCl reextrahiert. Die Extinktion wurde entsprechend den Gesamt-Porphyrinen im Spektrophotometer gemessen. Aus Wiederfindungsversuchen mit reinem Koproporphyrin wurde folgender Faktor gefunden:

E_{corr} x 73,6 = Koproporphyrin (nMol/h/g Leber)

2.7. Gewinnung und Bestimmung der mikrosomalen Proteine

3,0 g der frisch gewonnenen Leber wurde mit 12 ml 0,25 M Saccharose-Lösung im POTTER-S (nach Elvehjem) unter Eiskühlung homogenisiert. Danach erfolgte die Zentrifugation für 5 Min. bei 3000 U/min (Kühlzentrifuge bei 4^{o} C) und anschließend 20 Min. bei 11000 U/min. Der Überstand wird auf das 5-Fache des Volumens mit 0.0125 M Saccharose - Puffer, der 8 mM $CaCl_2$ enthält, aufgefüllt und 30 Min. bei 16000 U/min zentrifugiert. Der klare Überstand wird verworfen. Der Niederschlag (mikrosomale Fraktion) wird mit 0,1 M KCl/Tris - Puffer pH 7,5 resuspendiert und der Proteingehalt nach LOWRY et al. (19) bestimmt. Für die Bestimmung der Cytochrom P-450-abhängigen Reaktionen wurde die Mikrosomensuspension auf 6 mg Protein pro ml eingestellt.

2.8. Cytochrom P-450-Gehalt

Die Bestimmung des Cytochrom P-450-Gehalt der Leber erfolgt durch Messung des CO-Differenz-Spektrums des reduzierten Cytochroms (22).

Hierzu wurden 3 ml der Mikrosomensuspension (mit einem Proteingehalt von 1 mg/ml) etwa eine Minute mit CO begast und danach auf 2 Küvetten verteilt. Nach 3 bis 5 Minuten wurde das Cytochrom der einen Küvette durch Zugabe von Natriumdithionit reduziert und die Absorptions-Differenz im Vergleich zur Probe im Bereich zwischen 450 nm und 490 nm aufgezeichnet. Aus der maximalen Absorptions-Differenz berechneten wir mit dem molaren Extinktionskoeffizienten 104 nM^{-1} cm^{-1} (Homogenat) den Cytochrom P-450-Gehalt der Suspension der in µMol/mg mikrosomalen Proteins angegeben wird.

2.9. O-Desalkylierung von 7-Ethoxycoumarin

Die Bestimmung der O-Desalkylierungs-Aktivität des Cytochrom P-450 erfolgte nach der Methode von ULLRICH und WEBER (32) (s. Abb. 1).

In eine 1 ml Küvette gaben wir 0,9 ml 1 mM 7-Ethoxycoumarin und 0,1 ml Mikrosomen-Suspension. Der Ansatz wurde im Zeiss PM Q 2 auf 37^{o} C gebracht, und die Reaktion durch Zugabe von 5 µl 3 x 10^{-2} M NADPH gestartet. Die Messung erfolgte bei einer Anregung von 385 nm und einem Sperrfilter von 420 nm. Die Eichung erfolgte mit

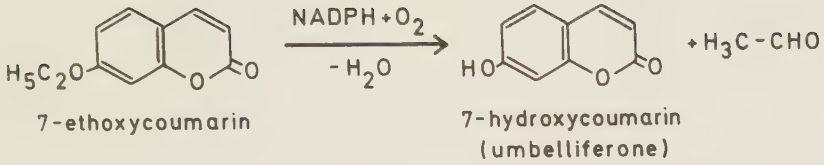

Abbildung 1 Desalkylierung von 7-EOC durch ein Cytochrom P-450-abhängiges Enzym

1 nmol 7-Hydroxycoumarin. Die spezifische Aktivität errechneten wir aus der Menge des gebildeten 7-Hydroxycoumarins in nmol 7-Hydroxycoumarin/min/mg mikrosomales Protein.
Zur Differenzierung des Cytochrom P-450 Typs untersuchten wir die in vitro-Hemmung der 7-Ethoxycoumarin-O-Desalkylase durch Metyrapon und Naphthoflavon. Hierzu gaben wir in den Testansatz 10 µl einer 1 mM Metyrapon-bzw. 10 µl einer 5 x 10^{-4} M Naphthoflavon-Lösung und bestimmten die Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit der Ausgangslage. (Der Phenobarbital-induzierte Typ (Cytochrom P-450) wird vorherrschend von Metyrapon und der Benzpyren-induzierte Typ (Cytochrom P-448) vorherrschend von Naphthoflavon gehemmt).

2.10. NADPH-Cytochrom c-Reduktase

Diese Bestimmung erfolgte nach der Methode von BARON u. TEPHLY (1).

Für einen Ansatz benötigten wir 1,9 ml Puffer (0,2 M K_3PO_4 pH 7,4), 10 µl 0,1 M NaCN, 1 ml 0,1 mM Cytochrom c-Lösung und 10 µl Mikrosomensuspension. Gestartet wurde die Reaktion mit 50 µl 0,01 M NADPH. Die Extinktionsänderung wurde bei 560 nm gemessen und mit dem Extinktionskoeffizienten 19,7 mM^{-1} cm^{-1} die Enzymaktivität berechnet.

2.11 Reagenzien

Hexachlorbenzol 98 % rein (Merck-Schuchardt, München, BRD), Ionenaustauscher-Fertigsäulen für die Porphyrin-, 5-Aminolävulinsäure- und Porphobilinogen-Bestimmung (BioRad, München), DC-Alufolien Kieselgel 60 F (Merck, Darmstadt, BRD), Uroporphyrinoctamethylester, Koproporphyrintetramethylester, Protoporphyrindimethylester (Sigma Chemicals, St. Louis, USA), 7-Hydroxycoumarin (EGA-Chemie, Steinheim, BRD), Naphthaflavon (Riedel-De Haen, Hannover, BRD), Metyrapon (CIBA-GEIGY, Wehr/Baden, BRD). Wir danken Herrn Prof. V. Ullrich (Homburg/Saar, BRD) für die Überlassung von 7-Ethoxycoumarin und der Bayer AG (Leverkusen, BRD) für das zur Verfügung gestellte Chloroquindiphosphat (Resochin^{R}). Das Cytochrom c (aus Pferdeherz) bezogen wir von Boehringer Mannheim (Mannheim, BRD).

3. Ergebnisse

3.1. Gesamt-Porphyrin-Ausscheidung im Urin (s. Tab. 1.1 und 1.2)

Alle Tiere, die nur mit HCB behandelt worden waren, hatten nach dem 51. Tag eine Porphyrie, die mit einer Gesamt-Porphyrin-Ausscheidung von über 40 µg/Tag definiert ist. Die beiden Chloroquin-Porphylaxe-Gruppen, denen von Beginn des Versuchs HCB und CQ in unterschiedlicher Dosierung (5 mg bzw. 25 mg/kg) verabreicht worden war, zeigten differente Ergebnisse. Die Tiere, die CQ in einer Dosierung von 5 mg/kg Körpergewicht erhalten hatten, zeigten gemessen an der Porphyrin-Ausscheidung im Urin während des gesamten Versuchs keine Abweichungen zu den HCB-Kontroll-Tieren. Dagegen manifestierte sich bei den Ratten, die gleichzeitig mit HCB auch 25 mg CQ pro kg Körpergewicht erhalten hatten, die Porphyrie später, und die Porphyrin-Ausscheidung lag während der gesamten Versuchsdauer (bis zum 107. Tag der HCB-Exposition) unter denen der HCB-Kontrollen).

Die CQ-Therapie, d.h. die CQ-Applikation nach dem 51. Tag ergab keine Veränderung der Porphyrin-Gesamtausscheidung im Vergleich zu den HCB-Kontrollen, wobei die HCB-Applikation unverändert fortgesetzt worden war. Die beiden unterschiedlichen Dosierungen - 5 bzw. 25 mg CQ/kg Körpergewicht - hatten keinen Einfluß auf den Verlauf der HCB-Porphyrie.

Bei der HCB-Absetz-Kontrollgruppe und der HCB-Absetz-Therapiegruppe wurden jeweils die HCB-Gaben nach dem 51. Tag abgesetzt. Das Weglassen des chlorierten

Benzols führte zunächst noch zu einem Anstieg der Porphyrin-Ausscheidung über einige Wochen. Danach sanken die Werte im Vergleich zu den HCB-Kontrollen stärker ab, wenngleich die Mittelwerte die Normalwerte nicht erreichten. Die andere Gruppe erhielt nach Absetzen des HCB zusätzlich 25 mg CQ pro kg Körpergewicht, wodurch die Porphyrin-Ausscheidung gegenüber der HCB-Absetz-Kontrolle deutlich, jedoch nicht signifikant, gesenkt werden konnte. Der Behandlungszeitraum von 56 Tagen dürfte zu kurz sein, um eine Normalisierung der Porphyrin-Ausscheidung zu erreichen.

3.2. Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Porphyrine (s. Tab. 5 u. 6)

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Porphyrine aus Leber und Urin zeigte nach der Manifestation der HCB-induzierten Porphyrie das für diese Stoffwechselstörung typische Muster: Vorherrschen der hochcarboxylierten Porphyrine (Uro- und Heptaporphyrin). Dieses Verteilungsmuster der Porphyrine lag auch nach Chloroquin-Gabe unverändert vor.

3.3. Porphobilinogen (PBG)-Ausscheidung (S. Tab. 2.1 u. 2.2)

Unter HCB-Gabe stieg die PBG-Ausscheidung schon nach 44 Tagen auf Werte um 100 mg/Tier/Tag an und steigerte sich bei Fortsetzung der HCB-Zufuhr auf Werte über 1000 mg/Tier/Tag. Die CQ-Applikation vom 51. Tag der HCB-Gabe konnte die PBG-Ausscheidung in beiden Dosierungen nicht beeinflussen. Das Absetzen des HCB nach dem 51. Tag bewirkte ein Absinken der PBG-Ausscheidung, jedoch wiederum keine Normalisierung.

Die zusätzliche CQ-Gabe hatte keinen nachweisbaren Effekt. Bei gleichzeitiger Gabe von HCB und CQ in einer Dosierung von 5 mg/kg Körpergewicht verzögerte sich der Anstieg der PBG-Ausscheidung. In der zweiten Hälfte des Versuches bestand jedoch dann kein Unterschied zu den anderen mit HCB-behandelten Gruppen. Die Tiere, die HCB und CQ in einer Dosierung von 25 mg/kg Körpergewicht erhielten, schieden im Vergleich zu den Kontrollen zwar erhöhte PBG-Mengen aus, diese lagen jedoch signifikant unter den Ausscheidungen aller übrigen mit HCB behandelten Tiere. Die alleinige Applikation von CQ bewirkte eine Erhöhung der PBG-Ausscheidung gegenüber der Kontroll-Gruppe.

3.4. 5-Aminolävulinsäure (ALA)-Ausscheidung (s. Tab. 3.1. u. 3.2)

Die Ausscheidung der ALA stieg unter HCB-Gabe bei allen Versuchsgruppen vom 14. Tag der Applikation deutlich an. Lediglich in der HCB+CQ-Prophylaxe-Gruppe (Dosierung: 25 mg) ergab sich kein Unterschied zur Kontrollgruppe. Nach Beendigung der HCB-Gabe bei der HCB-Absetz-Kontrollgruppe und der HCB-Absetz-Therapiegruppe fiel die ALA-Ausscheidung bis zum Versuchsende auf Normalwerte ab. Einen Einfluß von CQ konnten wir nicht nachweisen. Die alleinige Applikation von CQ führte zu keiner Änderung der ALA-Ausscheidung.

3.5. Cytochrom P-450-Gehalt (s. Tab. 4.1)

Sowohl die CQ-Kontrollen als auch die HCB-Kontrollen wiesen gegenüber den unbehandelten Ratten einen erhöhten Gehalt an Cytochrom P-450 in der Leber auf.

Dabei wurde bei den Tieren, die zusätzlich zu HCB CQ in der Dosierung 25 mg/kg Körpergewicht erhalten hatten, die höchsten Werte gemessen.

3.6. 7-Ethoxycoumarin (7-EOC)-O-Desalkylierungs-Aktivität

In den Lebern von allen Gruppen, die mit HCB, HCB und CQ oder mit CQ behandelt worden waren, fanden wir eine erhöhte 7-EOC-O-Desalkylierungs-Aktivität. Dabei steigerte CQ bei gleichzeitiger HCB-Gabe die Abhängigkeit von Dosis und Dauer der Applikation zusätzlich die 7-EOC-O-Desalkylierungs-Aktivität. Der Entzug von HCB bewirkte eine Senkung der 7-EOC-O-Desalkylierungs-Aktivität. Die Hemmung desEnzyms durch Metyrapon-Zugabe wurde durch die Behandlung mit HCB bzw. CQ nur geringfügig verändert. HCB steigerte die Naphthoflavon-Hemmung, wobei diese durch gleichzeitige CQ-Gabe noch verstärkt werden konnte.

3.7. NADPH-Cytochrom c-Reduktase

Sowohl HCB als auch CQ führen zu einer signifikanten Erhöhung der NADPH-Cytochrom c-Reduktase. Eine Steigerung dieser Enzym-Aktivität bei den Kombinationsbehandlungen war jedoch nicht festzustellen.

3.8. Uroporphyrinogen-Decarboxylase

Unter der HCB-Gabe sank die Aktivität dieses Enzyms signifikant ab. Chloroquin beeinflußte weder bei alleiniger Applikation noch bei kombinierter Gabe oder prophylaktischer Applikation die Uroporphyrinogen-Decarboxylase.

Tabelle 1.1 Gesamt-Porphyrinausscheidung (µg/24 h/Tier) im Urin unterschiedlich behandelter Ratten (s. Material und Methoden) Die Werte stellen Mittelwert und Standard-Abweichung ($\bar{x} \pm s$) von jeweils 4 Tieren dar.

	28 Tage	44 Tage	51 Tage	58 Tage	65 Tage	72 Tage
Kontrollen	8 ± 4	6 ± 2	9 ± 2	9 ± 4	7 ± 2	6 ± 3
CQ-Kontrollen	6 ± 3	7 ± 4	10 ± 2	9 ± 3	6 ± 1	8 ± 5
HCB-Kontrollen	11 ± 7	25 ± 15	39 ± 16	56 ± 15	129 ± 54	152 ± 59
HCB-Absetz-Kontrollen	11 ± 7	25 ± 15	39 ± 16	49 ± 26	104 ± 21	120 ± 60
HCB-Absetz-Therapie-Gruppe	11 ± 7	25 ± 15	39 ± 16	53 ± 19	105 ± 67	103 ± 29
HCB + CQ-Prophylaxe-Gruppe (5 mg)	7 ± 3	11 ± 9	20 ± 15	38 ± 31	88 ± 68	107 ± 35
HCB + CQ-Prophylaxe-Gruppe (25 mg)	8 ± 3	8 ± 3	9 ± 6	10 ± 10	22 ± 19	29 ± 35
CQ-Therapie-Gruppe (5 mg)	11 ± 7	25 ± 15	39 ± 16	47 ± 10	93 ± 39	141 ± 72
CQ-Therapie-Gruppe (25 mg)	11 ± 7	25 ± 15	39 ± 16	50 ± 21	83 ± 35	125 ± 36

Tabelle 1.2 Gesamt-Porphyrinausscheidung (µg/24 h/Tier) im Urin unterschiedlich behandelter Ratten (s. Material und Methoden) Die Werte stellen Mittelwert und Standard-Abweichung (x ± s) von jeweils 4 Tieren dar.

	79 Tage	86 Tage	93 Tage	100 Tage	107 Tage
Kontrollen	7 ± 3	11 ± 4	10 ± 4	8 ± 2	10 ± 3
CQ-Kontrollen	9 ± 3	8 ± 2	11 ± 4	10 ± 3	11 ± 3
HCB-Kontrollen	208 ± 41	291 ± 93	278 ± 48	265 ± 69	296 ± 89
HCB-Absetz-Kontrollen	189 ± 96	373 ± 237	262 ± 146	185 ± 118	216 ± 149
HCB-Absetz-Therapie-Gruppe	121 ± 31	127 ± 55	130 ± 39	122 ± 49	100 ± 48
HCB + CQ-Prophylaxe-Gruppe (5 mg)	195 ± 38	251 ± 53	293 ± 62	273 ± 47	285 ± 67
HCB + CQ-Prophylaxe-Gruppe (25 mg)	43 ± 25	54 ± 65	62 ± 70	69 ± 77	73 ± 83
CQ-Therapie-Gruppe (5 mg)	234 ± 90	296 ± 52	278 ± 67	292 ± 74	309 ± 54
CQ-Therapie-Gruppe (25 mg)	167 ± 40	223 ± 74	227 ± 60	259 ± 71	329 ± 79

Tabelle 2.1 Porphobilinogen-Gehalt (mg/24 h/Tier) im Urin unterschiedlich behandelter Ratten (s. Material u. Methoden) Die Werte stellen Mittelwert und Standard-Abweichung ($\bar{x} \pm s$) von jeweils 4 Tieren dar.

	28 Tage	44 Tage	51 Tage	58 Tage	65 Tage	72 Tage
Kontrollen	3 ± 1	5 ± 2	3 ± 2	8 ± 5	4 ± 3	4 ± 2
CQ-Kontrollen	11 ± 4	15 ± 6	14 ± 5	14 ± 7	12 ± 6	16 ± 7
HCB-Kontrollen	10 ± 7	92 ± 35	110 ± 32	238 ± 123	641 ± 243	419 ± 218
HCB-Absetz-Kontrollen	10 ± 7	92 ± 35	110 ± 32	101 ± 51	89 ± 56	73 ± 10
HCB-Absetz-Therapie-Gruppe	10 ± 7	92 ± 35	110 ± 32	96 ± 104	50 ± 21	26 ± 18
HCB + CQ-Prophylaxe-Gruppe (5 mg)	14 ± 2	22 ± 4	38 ± 19	58 ± 24	204 ± 106	209 ± 89
HCB + CQ-Prophylaxe-Gruppe (25 mg)	13 ± 6	20 ± 2	15 ± 5	7 ± 3	12 ± 8	15 ± 6
CQ-Therapie-Gruppe (5 mg)	10 ± 7	92 ± 35	110 ± 32	48 ± 50	53 ± 55	103 ± 64
CQ-Therapie-Gruppe (25 mg)	10 ± 7	92 ± 35	110 ± 32	244 ± 132	626 ± 605	228 ± 268

Tabelle 2.2 Porphobilinogen-Gehalt (mg/24 h/Tier) im Urin unterschiedlich behandelter Ratten (s. Material u. Methoden) Die Werte stellen Mittelwert und Standard-Abweichung ($\bar{x} \pm s$) von jeweils 4 Tieren dar.

	79 Tage	86 Tage	93 Tage	100 Tage	107 Tage
Kontrollen	7 ± 5	9 ± 3	4 ± 3	5 ± 4	9 ± 7
CQ-Kontrollen	11 ± 5	13 ± 7	16 ± 4	13 ± 4	15 ± 3
HCB-Kontrollen	303 ± 219	1233 ± 1447	1481 ± 1521	1019 ± 1289	964 ± 1378
HCB-Absetz-Kontrollen	59 ± 10	36 ± 5	42 ± 8	37 ± 18	50 ± 41
HCB-Absetz-Therapie-Gruppe	42 ± 6	68 ± 29	38 ± 10	21 ± 15	41 ± 12
HCB + CQ-Prophylaxe-Gruppe (5 mg)	632 ± 293	743 ± 145	815 ± 223	872 ± 281	1186 ± 586
HCB + CQ-Prophylaxe-Gruppe (25 mg)	54 ± 9	32 ± 14	51 ± 17	47 ± 39	40 ± 35
CQ-Therapie-Gruppe (5 mg)	323 ± 220	496 ± 223	403 ± 146	354 ± 121	252 ± 45
CQ-Therapie-Gruppe (25 mg)	285 ± 221	302 ± 249	461 ± 287	392 ± 269	512 ± 222

Tabelle 3.1 5-Aminolävulinsäure-Gehalt (mg/24 h/Tier) im Urin unterschiedlich behandelter Ratten (s. Material u. Methoden) Die Werte stellen Mittelwert und Standard-Abweichung ($\bar{x} \pm s$) von jeweils 4 Tieren dar.

	28 Tage	44 Tage	51 Tage	58 Tage	65 Tage	72 Tage
Kontrollen	44 ± 10	47 ± 17	38 ± 8	44 ± 12	52 ± 2	54 ± 19
CQ-Kontrollen	36 ± 6	40 ± 15	53 ± 10	49 ± 10	44 ± 15	55 ± 9
HCB-Kontrollen	43 ± 7	81 ± 24	65 ± 26	50 ± 20	87 ± 41	111 ± 60
HCB-Absetz-Kontrollen	43 ± 7	81 ± 24	65 ± 26	79 ± 32	59 ± 14	53 ± 9
HCB-Absetz-Therapie-Gruppe	43 ± 7	81 ± 24	65 ± 26	65 ± 9	86 ± 38	50 ± 6
HCB + CQ-Prophylaxe-Gruppe (5 mg)	68 ± 42	45 ± 9	47 ± 13	48 ± 12	105 ± 118	69 ± 49
HCB + CQ-Prophylaxe-Gruppe (25 mg)	40 ± 5	46 ± 1	49 ± 9	41 ± 11	53 ± 2	51 ± 8
CQ-Therapie-Gruppe (5 mg)	43 ± 7	81 ± 24	65 ± 26	52 ± 10	63 ± 6	52 ± 11
CQ-Therapie-Gruppe (25 mg)	43 ± 7	81 ± 24	65 ± 26	55 ± 25	82 ± 34	60 ± 19

Tabelle 3.2 5-Aminolävulinsäure-Gehalt (mg/24 h/Tier) im Urin unterschiedlich behandelter Ratten (s. Material u. Methoden) Die Werte stellen Mittelwert und Standard-Abweichung ($\bar{x} \pm s$) von jeweils 4 Tieren dar.

	79 Tage	86 Tage	93 Tage	100 Tage	107 Tage
Kontrollen	35 ± 9	41 ± 12	54 ± 15	37 ± 14	42 ± 20
CQ-Kontrollen	40 ± 11	51 ± 13	48 ± 11	15 ± 6	26 ± 18
HCB-Kontrollen	55 ± 14	134 ± 73	114 ± 56	158 ± 105	219 ± 100
HCB-Absetz-Kontrollen	43 ± 13	55 ± 5	50 ± 7	15 ± 7	25 ± 7
HCB-Absetz-Therapie-Gruppe	47 ± 2	56 ± 4	65 ± 18	47 ± 2	70 ± 7
HCB + CQ-Prophylaxe-Gruppe (5 mg)	115 ± 99	137 ± 54	142 ± 76	128 ± 94	273 ± 238
HCB + CQ-Prophylaxe-Gruppe (25 mg)	45 ± 12	50 ± 3	47 ± 10	54 ± 3	53 ± 4
CQ-Therapie-Gruppe (5 mg)	71 ± 31	122 ± 34	90 ± 13	78 ± 19	81 ± 21
CQ-Therapie-Gruppe (25 mg)	79 ± 52	85 ± 61	128 ± 58	83 ± 48	116 ± 56

Tabelle 4.1 Zusammenfassung aller Ergebnisse Die Zahlen stellen Mittelwert und Standard-Abweichung ($\bar{x} \pm s$) von jeweils 4 Tieren dar. Die Untersuchungen erfolgten am 107. Tag des Versuchs.

	Gewicht der Tiere (g)	Gewicht der Leber (g)	Porphyrine[+] (µg/24 h)	PBG[+] (mg/24 h)	ALA[+] (mg/24 h)
Kontrollen	253 ± 5	6,7 ± 1,0	10 ± 3	9 ± 7	42 ± 20
CQ-Kontrollen	233 ± 10	5,9 ± 0,5	11 ± 3	15 ± 3	26 ± 18
HCB-Kontrollen	258 ± 16	10,3 ± 1,2	296 ± 89	964 ± 1378	219 ± 100
HCB-Absetz-Kontrollen	270 ± 17	7,1 ± 0,4	216 ± 149	50 ± 41	25 ± 7
HCB-Absetz-Therapie-Gruppe	245 ± 20	7,4 ± 0,9	100 ± 48	41 ± 12	70 ± 7
HCB + CQ-Prophylaxe-Gruppe (5 mg)	216 ± 14	9,3 ± 0,8	285 ± 67	1186 ± 586	273 ± 238
HCB + CQ-Prophylaxe-Gruppe (25 mg	223 ± 10	9,2 ± 1,2	73 ± 83	40 ± 35	53 ± 4
CQ-Therapie-Gruppe (5 mg)	250 ± 13	10,4 ± 0,8	309 ± 54	252 ± 45	81 ± 21
CQ-Therapie-Gruppe (25 mg)	253 ± 6	10,4 ± 1,8	329 ± 79	512 ± 222	116 ± 56

+) letzte gemessene Ausscheidung

Tabelle 4.2 Zusammenfassung aller Ergebnisse Die Zahlen stellen Mittelwert und Standard-Abweichung ($\bar{x} \pm s$) von jeweils 4 Tieren dar. Die Untersuchungen erfolgten am 107. Tag des Versuchs.

	Ethoxycoumarin-O-Desalkylierung[+)]	Hemmung der Metyrapon (%)	Hemmung durch Naphtoflavon (%)
Kontrollen	0,46 ± 0,05	10 ± 1	13 ± 9
CQ-Kontrollen	1,09 ± 0,1	5 ± 2	34 ± 6
HCB-Kontrollen	1,74 ± 0,53	7 ± 3	48 ± 8
HCB-Absetz-Kontrollen	0,86 ± 0,18	19 ± 7	34 ± 12
HCB-Absetz-Therapie-Gruppe	1,43 ± 0,17	15 ± 8	32 ± 14
HCB + CQ-Prophylaxe-Gruppe (5 mg)	2,64 ± 0,91	9 ± 4	59 ± 10
HCB + CQ-Prophylaxe-Gruppe (25 mg)	4,01 ± 1,11	11 ± 2	48 ± 1
CQ-Therapie-Gruppe (5 mg)	1,93 ± 0,66	7 ± 2	55 ± 5
CQ-Therapie-Gruppe (25 mg)	2,49 ± 0,45	11 ± 3	53 ± 1

+) $\frac{\text{nmol Umbelliferon}}{\text{min x mg Protein}}$

Tabelle 4.3 Zusammenfassung aller Ergebnisse Die Zahlen stellen Mittelwert und Standard-Abweichung ($\bar{x} \pm s$) von jeweils 4 Tieren dar. Die Untersuchungen erfolgten am 107. Tag des Versuchs.

	P-450-Gehalt (µmol/mg Prot.)	Uroporphyrinogen-Decarboxylase+)	NADPH-Cytochrom c-Reduktase++)
Kontrollen	0,53 ± 0,15	6,71 ± 1,66	76 ± 10
CQ-Kontrollen	0,71 ± 0,07	4,83 ± 0,91	124 ± 23
HCB-Kontrollen	0,99 ± 0,12	1,81 ± 1,02	120 ± 19
HCB-Absetz-Kontrollen	0,96 ± 0,07	0,30 ± 0,16	122 ± 9
HCB-Absetz-Therapie	0,84 ± 0,05	0,50 ± 0,10	122 ± 11
HCB + CQ-Prophylaxe-Gruppe (5 mg)	0,60 ± 0,15	0,80 ± 0,15	136 ± 10
HCB + CQ-Prophylaxe-Gruppe (25 mg)	1,12 ± 0,36	2,18 ± 1,21	130 ± 24
CQ-Therapie-Gruppe (5 mg)	0,64 ± 0,16	0,51 ± 0,36	126 ± 37
CQ-Therapie-Gruppe (25 mg)	0,99 ± 0,14	1,08 ± 0,10	123 ± 12

+) $\frac{\text{nmol Koproporphyrinogen}}{\text{h x g Leber}}$ ++) $\frac{\text{nmol}}{\text{min x mg Protein}}$

Tabelle 5 Dünschichtchromatographische Auftrennung der Porphyrine des zuletzt ausgeschiedenen 24 - h-Urins. Die Zahlen stellen Mittelwert und Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$) von jeweils 4 Tieren dar. Die Untersuchungen erfolgten am 107. Tag des Versuchs.

Werte in µg/24 h-Urin	Gesamt-Porphyrine	Uro	Hepta	Hexa	Penta	Kopro	Tri	Proto
HCB-Absetz-Kontroll-Gruppe	216 ± 149	120,5 ± 10,4	41,2 ± 8,9	24,1 ± 3,4	5,4 ± 1,7	22,3 ± 3,9	2,8 ± 4,6	0,4 ± 0,6
HCB-Absetz-Therapie-Gruppe	100 ± 48	59,1 ± 6,5	17,2 ± 1,4	9,8 ± 3,2	2,4 ± 1,6	8,3 ± 8,3	2,6 ± 2,3	0,6 ± 0,4
Werte in %								
HCB-Absetz-Kontroll-Gruppe	100	55,8 ± 4,8	19,1 ± 4,1	11,2 ± 1,6	2,5 ± 0,8	9,9 ± 1,8	1,3 ± 2,3	0,2 ± 0,3
HCB-Absetz-Therapie-Gruppe	100	59,1 ± 6,5	17,2 ± 1,4	9,8 ± 3,2	2,4 ± 1,6	8,3 ± 8,3	2,6 ± 2,3	0,6 ± 0,4

Tabelle 6 Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Leberporphyrine. Die Zahlen stellen Mittelwert und Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$) von jeweils 4 Tieren dar. Die Untersuchungen erfolgten am 107. Tag des Versuchs.

	Gesamt-Porphyrine	Uro	Hepta	Hexa	Penta	Kopro	Tri	Proto
Werte in µg/g Leber								
HCB-Absetz-Kontroll-Gruppe	12,7 ± 4,2	9,1 ± 1,5	3,3 ± 1,3	0,3 ± 0,2	---	---	---	---
HCB-Absetz-Therapie-Gruppe	10,3 ± 1,7	7,4 ± 0,4	2,6 ± 0,8	0,1 ± 0,08	---	0,03 ± 0,04	0,1 ± 0,2	0,01 ± 0,02
Werte in %								
HCB-Absetz-Kontroll-Gruppe	100	72 ± 11,3	26 ± 10,3	2 ± 1,4	---	---	---	---
HCB-Absetz-Therapie-Gruppe	100	72 ± 4,2	25 ± 7,5	1,2 ± 0,8	---	0,3 ± 0,4	1,4 ± 2,4	0,1 ± 0,2

4. DISKUSSION

CQ wird schon seit zwei Jahrzehnten zur Therapie der menschlichen PCT angewandt. Obwohl durch zahlreiche Veröffentlichungen (12,16,26,34) die Wirksamkeit des CQ bei dieser Erkrankung nachgewiesen wurde, sind die Wirkmechanismen oder Angriffspunkte der Behandlung noch weitgehend unklar. Eine Erklärungsmöglichkeit bieten die Ergebnisse von SCHOLNICK und Mitarbeitern (27), die bei der DDC (3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidin)-induzierten Porphyrie der Ratte die Bildung von wasserlöslichen CQ-Porphyrinkomplexen, die vermehrt im Urin ausgeschieden wurden, nachwiesen. (Allerdings liegt der DDC-Porphyrie ein anderer Mechanismus - nämlich die Hemmung der Ferrochelatase - zugrunde, sodaß es zu einer Vermehrung der niedrig carboxylierten Porphyrine, vorherrschend des Protoporphyringehalts kommt.)
Durch diesen Mechanismus könnte auch bei der PCT des Menschen eine Verringerung der Porphyrinablagerungen und damit eine Verbesserung des klinischen Bildes verursacht werden. Damit wäre diese Therapie mit der Uralyt-U-Behandlung vergleichbar, der ebenfalls eine Verstärknng der Porphyrin-Ausscheidung, allerdings über renale Mechanismen, zugrundeliegt. Dies müßte aber mit einer initial überschießenden oder kontinuierlichen Erhöhung der Porphyrin-Ausscheidung verbunden sein.
Die Ergebnisse unseres Versuches konnten jedoch diese Vorstellung über die CQ-Wirkung nicht bestätigen, da nach Beginn der CQ-Behandlung bei den Versuchstieren kein Anstieg der Porphyrin-Ausscheidung erfolgte. Außerdem war der Porphyrin-Gehalt der Lebern der Tiere aus den HCB-Absetz-Kontrollen (s. Material u. Methoden S. 4) und der HCB-Absetz-Therapie-Gruppe ohne signifikante Differenz, was gegen eine primäre Eliminationswirkung durch CQ spricht. In der Gruppe, die kontinuierlich mit HCB und

25 mg CQ pro kg Körpergewicht behandelt worden war, blieb die Porphyrin-Ausscheidung deutlich unter den Werten aller anderen mit HCB behandelten Tiere . Insgesamt sprechen diese Ergebnisse gegen eine Ausschwemmung der Porphyrine als Wirkungsmechanismus der CQ-Therapie, sondern vielmehr für eine verminderte Porphyrin-Synthese durch dieses Chinolinderivat.

Der erste Schritt der Häm-Biosynthese ist die Bildung von 5-Aminolävulinsäure aus Succinyl-CoA und Glycin in den Mitochondrien durch die ALA-Syntase (EC.2.3.1.37). Das Succinyl-CoA wird im Citronensäurecyklus gebildet, und die Aminosäure Glycin gelangt aus dem Cytoplasma in die Mitochondrien der Leberzelle (s.Abb. 2).
N. SIMON (29) nimmt an, daß die HCB-induzierte Porphyrie durch eine Schädigung der Zellmembran-Strukturen durch HCB-Einlagerungen entsteht. Er wies nach, daß die Durchlässigkeit von Membranen für Glycin nach HCB-Gabe erhöht war (29). Den Zellmembranen schreibt er eine wichtige Regulationsfunktion für die Häm-Synthese zu. Diese Überlegungen lassen sich in Einklang mit der von uns beobachteten Schutzwirkung des CQ bringen. Wir konnten zeigen, daß die gleichzeitige Gabe von HCB und CQ (25 mg pro kg Körpergewicht) eine Verzögerung und Abschwächung der HCB-induzierten Porphyrie bewirkt.

Im Gegensatz zu der ausgeprägten protektiven Wirkung des CQ auf die Manifestation der HCB-Porphyrie, zeigte das Chinolinderivat keinen therapeutischen Effekt, d.h. die bereits manifeste HCB-Porphyrie ließ sich durch CQ nicht beeinflussen. Dies könnte bedeuten, daß bei gleichzeitiger HCB- und CQ-Applikation die HCB-bedingte Membranschädigung vermindert werden kann, daß aber andererseits die manifeste Membranschädigung durch CQ nicht mehr verändert werden kann. Die CQ-Wirkung auf Membranen könnte

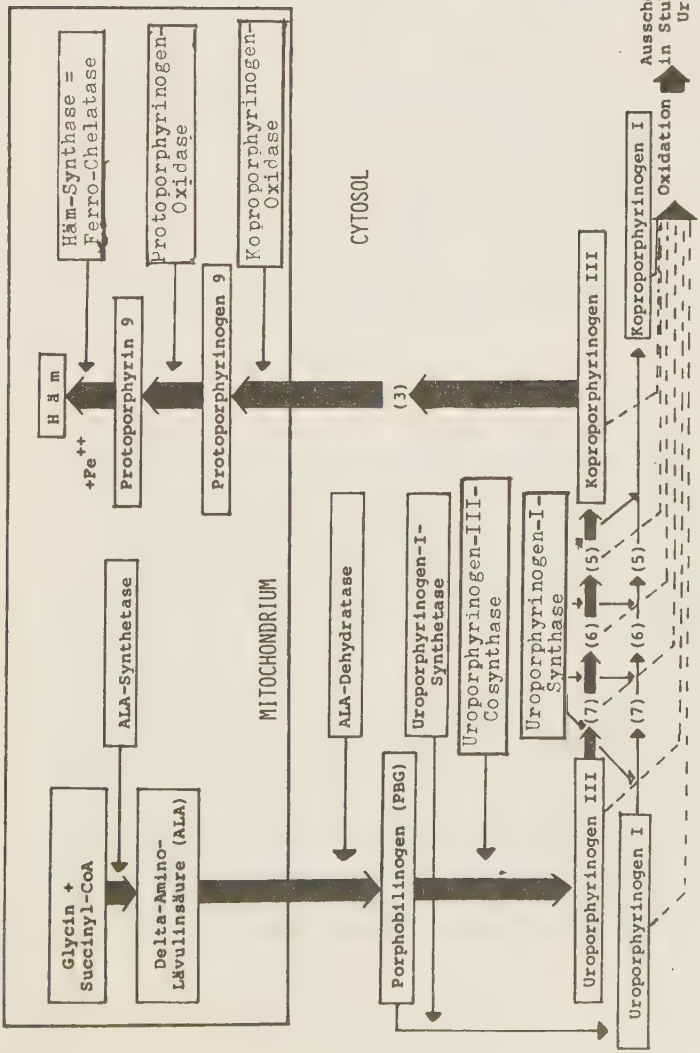

Abbildung 2 Biosynthese der Porphyrine

auch dem Effekt des CQ bei der menschlichen PCT zugrundeliegen. Nach den Befunden von KUSHNER et al. (17) ist ein hereditärer Enzymdefekt der Uroporphyrinogen-Decarboxylase eine Voraussetzung für die Entwicklung der PCT. Somit könnte eine leichte Membranschädigung, die durch CQ noch zu beheben ist, zur Manifestation der PCT führen. Unter HCB-Gabe sind dagegen erheblich stärkere, wahrscheinlich irreversible, Membranschädigungen anzunehmen, die nicht mehr durch CQ zu beeinflussen sind. Dies ist um so verständlicher, da sich die Häm-Biosynthese in verschiedenen Zellkompartimenten abspielt.
CQ führt bei den Ratten zu einer Vermehrung des mischfunktionellen Monooxygenase-System, was besonders an der Steigerung der 7-Ethoxycoumarin-Deethylase nachweisbar ist. Diese Induktion läßt sich auch bei den HCB-Tieren noch nachweisen. Die HCB-Prophylaxe-Gruppe (25 mg CQ) zeigt dabei die höchste Aktivität. In dieser Gruppe ist aber andererseits die HCB bedingte Porphyrin-Stoffwechsel-Störung im Vergleich zu den HCB-Kontrollen wesentlich geringer ausgeprägt. Dies weist darauf hin, daß die HCB bedingte Induktion des mikrosomalen Monooxygenase Systems und die Entstehung der Porphyrin-Stoffwechsel-Störung nicht kausal miteinander verknüpft sind.

CQ hemmt außerdem die Nukleinsäure-Synthese (10), woraus auf eine zusätzliche Beeinflussung der Enzyme der Häm-Biosynthese durch CQ geschlossen wird, die eventuell die Rückbildung der PCT bewirken könnte.
Bei der menschlichen PCT und der HCB-induzierten Porphyrie deutet das Ausscheidungsmuster der Porphyrine hauptsächlich auf eine Schädigung der Uroporphyrinogen-Decarboxylase hin. Ein wünschenswertes Arzneimittel zur Behandlung

der menschlichen PCT bzw. der HCB-Porphyrie der Ratte sollte deshalb eine Induktion der endogen oder exogen verminderten Enzym-Aktivität bewirken. In dieser Hinsicht entäuschte CQ als Therapeutikum (s. Tabelle 4), da es eher zu einer Minderung der Uroporphyrinogen-Decarboxylase-Aktivität führt (s. CQ-Kontrollen). Bei gleichzeitiger CQ und HCB-Gabe zeigt Resochin eine dosisabhängige Wirkung: In niedriger Dosierung (5 mg pro kg) verstärkt es die HCB-bedingte Enzymhemmung, während es in hoher Dosierung die HCB-Wirkung abschwächt. Dieser Effekt erklärt die Minderung der Porphyrin-Ausscheidung bei der "Prophylaxe"-Gruppe. Bei bereits manifester Porphyrie (menschliche PCT oder tierexperimentelle HCB-Porphyrie) liegen wahrscheinlich andere Verhältnisse vor, sodaß noch nicht sicher zu beurteilende Faktoren hinzutreten.

GROSSMANN et al. (13) fanden bei 80% ihrer PCT-Patienten eine Siderose der Leber. In Ländern - wie z.B. in Afrika (Bantu-Neger) -, in denen stark eisenhaltige Alkoholika (Bier) genossen werden, tritt die PCT auffällig häufig auf (23,24). Im entsprechenden Krankengut der Düsseldorfer Hautklinik fanden sich ebenfalls Hinweise auf eine Fe-Applikation in der Medikamenten-Anamnese der Patienten und bei einigen Patienten über mehrere Jahre wiederholte Bluttransfusionen (GOERZ,G. und HAMMER,G. - persönliche Mitteilung). Von KUSHNER et al. (18) wurde durch in vitro Versuche gezeigt, daß die Uroporphyrinogen-Decarboxylase und die Uroporphyrinogen-III-Co-Synthase durch Fe^{2+} bei Vorhandensein eines entsprechenden Reduktions-Potentials, insbesondere SH-Gruppen tragende Substanzen, z.B. Cystein, gehemmt werden. Die Autoren wiesen außerdem nach, daß bei gleichen eingesetzten ALA- und PBG-Mengen unter diesen Bedingungen größere Porphyrin-Mengen gebildet werden.

IATROPOULOS et al. (14) fanden bei histologischen Untersuchungen an weiblichen Rhesus-Affen nach HCB-Gabe Hämosiderin-Ablagerungen in der Leber. Diese Befunde werden durch die Ergebnisse von TALJAARD et al. (31) noch unterstützt. Sie konnten zeigen, daß bei der HCB-induzierten Porphyrie der Ratte durch gleichzeitige Eisengabe ein verstärkt ausgeprägtes Krankheitsbild auftritt.
Bei PCT-Patienten fanden die Autoren (31) unter CQ-Therapie eine gesteigerte Eisenausscheidung im Urin. Diese Eiseneliminierung könnte eine Ursache der CQ-Wirkung auf die menschliche PCT und die tierexperimentelle Porpyhrie sein (durch DDC (27) und HCB), wobei jedoch der Angriffspunkt des CQ im Eisenstoffwechsel nicht bekannt ist. Dennoch bieten diese Überlegungen die Möglichkeit, die Erfolge der CQ-Therapie und der Aderlaß-Therapie nach IPPEN (15) mit einem gemeinsamen Wirkprinzip zu erklären. Der Erfolg der CQ-Prophylaxe bei der HCB-Porphyrie der Ratte könnte neben einer Beeinflussung der Uroporphyrinogen-Decarboxylase durch eine Verzögerung der Eisenablagerung verursacht werden. Das Versagen der CQ-Therapie bei unseren Tieren, insbesondere auch nach Absetzen des Porphyrogens HCB, läßt sich jedoch mit den bisherigen Überlegungen und Hypothesen nicht ausreichend erklären. Es ist vielleicht vorstellbar, daß über eine Beeinflussung des Fe-Stoffwechsels (Fe-Ablagerung), eine Rückwirkung auf die Plasmamembran und durch Modifikation der Uroporphyrinogen-Decarboxylase CQ einen therapeutischen Effekt auf die menschliche PCT und eine prophylaktische Wirkung auf die HCB-Porphyrie der Ratte hat.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit untersuchten wir den Einfluß von Chloroquin (CQ) auf die Hexachlorbenzol (HCB)-induzierte Porphyrie der Ratte. Hierzu teilten wir weibliche Wistar-Ratten in 9 Versuchsgruppen ein:

I. Kontrollen (unbehandelte Tiere)

II. CQ-Kontrollen (6 mal pro Woche 25 mg CQ/kg Körpergewicht)

III. HCB-Kontrollen (0,05% HCB-haltiges Futter während des gesamten Versuchs)

IV. HCB-Absetz-Kontrollen (0,05% HCB-haltiges Futter bis zum 51. Tag)

V. HCB-Absetz-Therapie-Gruppe (wie Gruppe IV., ab 51. Tag 25 mg CQ/kg Körpergewicht)

VI. HCB + 5 mg CQ-Prophylaxe-Gruppe (während des ganzen Versuchs HCB-haltiges Futter und 5 mg CQ/kg Körpergewicht)

VII. HCB + 25 mg CQ-Prophylaxe-Gruppe (wie Gruppe VI., jedoch 25 mg CQ/kg Körpergewicht)

VIII. 5 mg CQ-Therapie-Gruppe (HCB-haltiges Futter während des gesamten Versuchs, ab 51. Tag zusätzlich 5 mg CQ/kg Körpergewicht)

IX. 25 mg CQ-Therapie-Gruppe (wie Gruppe VIII., jedoch 25 mg CQ/kg Körpergewicht)

Alle HCB-behandelten Tiere entwickelten eine Porphyrie, die mit Ausnahme der Gruppe VII. (HCB + CQ-Prophylaxe-Gruppe (25 mg)) mit einer stark erhöhten Porphobilinogen

(PBG)- und einer mäßig erhöhten 5-Aminolävulinsäure (ALA)-Ausscheidung einherging. Bei der manifesten Porphyrie zeigte CQ keinen therapeutischen Effekt. Im Gegensatz hierzu bewirkte die prophylaktische CQ-Gabe einen verzögerten Eintritt und eine deutlich schwächere Ausprägung der HCB-induzierten Porphyrie, allerdings nur bei der Dosierung von 25 mg CQ/kg Körpergewicht/Tag.

Nach Absetzen des HCB zeigte sich ein spontanes Absinken der Porphyrin-Ausscheidungen, die jedoch innerhalb der gewählten Versuchsdauer nicht die Normalwerte erreichten. Auf diese Rückbildung der Porphyrine hatte eine zusätzliche CQ-Therapie keinen nennenswerten Einfluß. Auch die Ergebnisse der chromatographischen Auftrennung von Leber- und Urin-Porphyrinen zeigte keinen Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen. In den Lebern der Versuchstiere untersuchten wir zusätzlich den Cytochrom P-450-Gehalt und die 7-Ethoxycoumarin(7-EOC)-O-Desalkylierungs-Aktivität. Sowohl die HCB- als auch die CQ-Behandlung führten zu erhöhten Meßwerten, wobei sich die höchsten Werte bei gleichzeitiger Applikation von HCB und CQ ergaben. Zwischem dem Cytochrom P-450-Gehalt und dem Grad der Porphyrie bestand keine Korrelation, sodaß eine ursächliche Beteiligung des Cytochrom P-450-Systems an der Entstehung der Porphyrie unwahrscheinlich erscheint.

Die Aktivität der NADPH-Cytochrom c-Reduktase wurde durch die HCB- und CQ-Gabe signifikant gesteigert. Die durch HCB-Behandlung deutlich verminderte Aktivität der Uroporphyrinogen-Decarboxylase wurde durch CQ nicht beeinflußt. Insgesamt zeigten unsere Ergebnisse, daß CQ weder eine vermehrte Porphyrin-Elimination noch einen Anstieg der Uroporphyrinogen-Decarboxylase-Aktivität bewirkt. Als Ursache für die CQ-Wirkung bei der menschlichen PCT vermuten wir eine Beeinflussung der Membranfunktionen und des Eisenstoffwechsels durch CQ.

6. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

ALA	5-Aminolävulinsäure
CoA	Coenzym A
CQ	Chloroquin
DDC	3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidin
7-EOC	7-Ethoxy-Coumarin
HCB	Hexachlorbenzol
PBG	Porphobilinogen
PCT	Porphyria cutanea tarda
s	Standardabweichung
$\bar{x}$	Mittelwert
DTE	1,4-Dithioerythril
CO	Kohlenmonoxid

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. BARON, J., TEPHLY, T.R.:
Effect of 3-amino-1,2,4-triazole on the stimulation of hepatic microsomal heme synthesis and induction of hepatic microsomal oxidases produced by phenobarbital.
Mol. Pharmacol. 5, 10-20 (1969)

2. BRODIE, M.J., THOMPSON, G.G., MOORE, M.R., BEATTIE, A.D., GOLDBERG, A.:
Heriditary coproporphyria.
Q. J. Med. 182, 229-241 (1977)

3. CAM, C., NIGOGOSYAN, G.:
Acquired toxic porphyria cutanea tarda due to hexachlorbenzene.
J. Amer. Med. Ass. 183, 88-91 (1963)

4. CRIPPS, D.J., GOCMEN, A., PETERS, H.A.:
Porphyria Turcica. Twenty years after hexachlorbenzene intoxication.
Arch. Dermatol. 116, 46-50 (1980)

5. DOSS, M.:
Analytical and preparative thin-layer chromatography of porphyrin methyl esters.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 8, 197-207 (1970)

6. DOSS, M., SCHMIDT, A.:
Rapid determination of urinary total porphyrins by ion exchange chromatography.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 9, 415-420 (1971)

7. DOSS, M., SCHMIDT, A.:
Quantitative Bestimmung der δ-Aminolävulinsäure im Urin mit Ionenaustauschchromatographie-Fertigsäulen.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 9, 99-102 (1971)

8. ELDER, G.H., PATH, M.R.C., LEE, G.E., TOVEY, J.A.:
Decreased activity of hepatic uroporphyrinogen-decarboxylase in sporadic porphyria cutanea tarda.
New Engl. J. Med. 299, 274-278 (1978)

9. FELSHER, B.F., NORRIS, M.E., SHIH, J.C.:
Red cell uroporphyrinogen-decarboxylase activity in porphyria cutanea tarda and in other forms of porphyria.
New Engl. J. Med. 299, 1095-1098 (1978)

10. GAUDIN, G., GREGG, R.S., YIELDING, K.L.:
Inhibition of DNA repair replication by DNA binding drugs with sensitized cells to alkylating agents and X-rays.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 141, 543-545 (1972)

11. GOERZ, G.:
Die Porphyrin-Krankheiten.
In: Korting, G.W. (Hrsg.): Dermatologie in Klinik und Praxis III. Thieme Verlag Stuttgart 38.43 - 38.69 (1979)

12. GOERZ, G., KRIEG, T.:
Porphyria cutanea tarda: Therapiemöglichkeiten und Ergebnisse.
Dtsch. med. Wschr. 103, 1329-1333 (1978)

13. GROSSMANN, M.E., BLICKERS, D.R., POH-FITZPATRICK, M.B., DELEC, V.A., HARBER, L.C.:
Porphyria cutanea tarda. Clinical features and laboratory findings in 40 patients.
Amer. J. Med. 67, 277-286 (1979)

14. IATROPOULOS, M.J., HOBSON, W., KNAUF, V., ADAMS, H.P.:
Morphological Effects of Hexachlorbenzene Toxicity in Female Rhesus Monkeys.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 37, 433-444 (1976)

15. IPPEN, H.:
Allgemeinsymptome der späten Hautporphyrie (Porphyria cutanea tarda) als Hinweis für deren Behandlung.
Dtsch. med. Wschr. 86, 127-133 (1961)

16. KORDAC, V., SEMRADOVA, M.:
Treatment of porphyria cutanea tarda with chloroquine.
Brit. J. Derm. 90, 95-100 (1974)

17. KUSHNER, J.P., BARBUTO, A.J., LEE, G.R.:
An inherited enzymatic defect in porphyria cutanea tarda. Decreased uroporphyrinogen decarboxylase activity.
J. Clin. Invest. 58., 1089-1097 (1976)

18. KUSHNER, J.P., LEE, G.R., NACHT, S.:
The role of iron in the pathogenesis of porphyria cutanea tarda. An in vitro model.
J. Clin. Invest. 51, 3044-3050 (1972)

19. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.S.:
Protein measurement with folen phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

20. MAUZERAL, D., GRANICK, S.:
Porphyrin biosynthesis in erythrocytes. III-uroporphyrinogen and its decarboxylase.
J. Biol. Chem. 232, 1141-1163 (1958)

21. OCKNER, R.K., SCHMID, R.:
Acquired porphyria in man and rat due to hexachlorbenzene.
J. Amer. Med. Ass. 183, 88-91 (1963)

22. OMURA, R., SATO, R.:
The carbonmonoxide-binding pigment of liver microsomes.
J. Biol. Chem. 239, 2370-2378 (1964)

23. PERMAN, G.:
Hemochromatosis and red wine.
Acta Med. Scand. 182, 281-284 (1967)

24. SAUNDERS, S.J., WILLIAMS, J., LEVEY, M.:
Iron metabolism in symptomatic porphyria: a preliminary communication.
S. Afr. J. Lab. Clin. Med. 9, 277-287 (1963)

25. SCHMID, R.:
Cutaneous porphyria in Turkey.
New Engl. J. Med. 263, 397-398 (1960)

26. SCHOLNICK, P., MARVER, H.:
The molecular basis of chloroquine responsiveness in porphyria cutanea tarda.
Clin. Res. 16, 258-263 (1968)

27. SCHOLNICK, P., PERRY, L., EPSTEIN, J., MARVER, H.:
The molecular basis of the action of chloroquine in porphyria cutanea tarda.
J. Invest. Derm. 61, 226-232 (1973)

28. STONARD, M.D.:
Experimental hepatic porphyria induced by hexachlorbenzene as a model for human symptomatic porphyria.
Br. J. Haematol. 27, 617-625 (1974)

29. SIMON, N.:
Nach: Klinische Biochemie der Porphyrien.
Kongressbericht Dr. Falk. Falk-Foundation e.V. 18, 35 (1975)

30. SWANBECK, G., WENNERSTEN, G.:
Treatment of porphyria cutanea tarda with chloroquine and phlebotomy.
Br. J. Dermatol. 97, 77-81 (1977)

31. TALJAARD, J.J.F., SHANLEY, P.C., STEWART-WYNNE, E.G., DEPPE, W.M., JOUBERT, S.M.:
Studies on low-dose chloroquine therapy and the action of chloroquine in symptomatic porphyria.
Br. J. Dermatol. 87, 261-269 (1972)

32. ULLRICH, V., WEBER, P.:
The O-dealcylation of 7-ethoxycoumarin by liver microsomes.
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 353, 1171-1177 (1972)

33. VIZETHUM, W., BOLSEN, K., SIMON, K., WEBER, K., GOERZ, G.:
Einfluß von Chloroquin auf die Hexachlorbenzol-induzierte Porphyrie.
Untersuchungen in Haut, Leber und Urin.
Arch. Dermatol. Res. 267, 123-130 (1980)

34. VOGLER, W.R., GALAMBOS, J.T., OLANSKY, S.:
Biochemical effect of chloroquine therapy in porphyria cutanea tarda.
Amer. J. Med. 49, 316-321 (1970)

DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. med. Dr. phil. A. GREITHER, Direktor der Universitäts-Hautklinik Düsseldorf, danken wir für die uns gewährte Arbeitsmöglichkeit an seiner Klinik.

Unser besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. G. GOERZ für die Überlassung des Themas, für seine ständige Hilfsbereitschaft, für seine fördernden Diskussionen und für die Hilfe bei der Abfassung des Textes.

Bei Herrn Dr. rer. nat. W. VIZETHUM und Herrn K. BOLSEN bedanken wir uns für die Einweisung in die Methodik, die freundliche Hilfe bei der Versuchsdurchführung und für die Unterstützung bei der Auswertung der Ergebnisse.

LEBENSLAUF - Kurt SIMON

Am 20.7.1955 wurde ich in Hilden/Rheinland als erstes Kind der Eheleute Wilhelm und Antonette Simon geboren.

Nachdem ich von 1962 bis 1966 die Grundschule besucht hatte, trat ich in das Städtische Helmholtz-Gymnasium, Hilden, ein, wo ich 1974 die Reifeprüfung ablegte.

Nach Ableistung meines Zivildienstes begann ich im Wintersemester 1975/76 an der Universität Düsseldorf das Studium der Medizin.

LEBENSLAUF - Kurt WEBER

Am 30.6.1947 wurde ich in Koblenz als Sohn der Eheleute Anton und Magdalena Weber geboren.

Nach acht Volksschuljahren in Mönchengladbach begann ich eine Lehre als Werkzeugmacher, die ich mit der Facharbeiterprüfung nach dreieinhalb Jahren abschloß.

Von 1965 bis 1973 war ich zunächst als Polizeibeamter, dann als Kriminalbeamter tätig.

Von 1973 bis 1975 besuchte ich das Erzbischöfliche Friedrich-Spee-Kolleg in Neuss, wo ich das Reifezeugnis erwarb.

Seit dem Wintersemester 1975/76 studiere ich an der Universität Düsseldorf Medizin.